

cited in the European Search
Report of EP 9854 0388.3
Your Ref.: 56446-20016.48

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-327684

(43) 公開日 平成7年(1995)12月19日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 15/09

Z N A

9/12

// (C 1 2 N 15/09

Z N A

9281-4B

C 1 2 N 15/ 00

Z N A A

(C 1 2 N 15/ 00

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平6-150591

(22) 出願日

平成6年(1994)6月9日

(71) 出願人 591038141

資酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72) 発明者 上森 隆司

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造
株式会社中央研究所内

(72) 発明者 石野 良純

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造
株式会社中央研究所内

(72) 発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造
株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

(54) 【発明の名称】 DNAポリメラーゼ遺伝子

(57) 【要約】

【目的】 新規のDNAポリメラーゼ遺伝子を特定し、
該遺伝子を用いる新規DNAポリメラーゼの遺伝子工学的
製造法を提供する。

【構成】 配列表の配列番号1若しくは2で示されるア
ミノ酸配列、又はそれらの一部であって、かつ、DNA
ポリメラーゼ活性を有する部分をコードするDNAポリ
メラーゼ遺伝子。該遺伝子に厳密な条件下でハイブリダ
イズ可能なDNAポリメラーゼ遺伝子。前記いずれかの
遺伝子を含むプラスミドを保有する形質転換体を培
養し、該培養物から相当する前記のDNAポリメラーゼ
遺伝子がコードするDNAポリメラーゼを採取するDN
Aポリメラーゼの製造方法。

【効果】 耐熱性DNAポリメラーゼが提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1若しくは2で示されるアミノ酸配列、又はそれらの一部であって、かつ、DNAポリメラーゼ活性を有する部分をコードするDNAポリメラーゼ遺伝子。

【請求項2】 請求項1に記載のDNAポリメラーゼ遺伝子に厳密な条件下でハイブリダイズ可能なDNAポリメラーゼ遺伝子。

【請求項3】 請求項1又は2に記載のDNAポリメラーゼ遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体を培養し、該培養物から請求項1又は2に記載のDNAポリメラーゼ遺伝子がコードするDNAポリメラーゼを採取することを特徴とするDNAポリメラーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規のDNAポリメラーゼ遺伝子及びDNAポリメラーゼの遺伝子工学的製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 今まで遺伝子工学研究用試薬として一般に利用されているDNAポリメラーゼとしては、大腸菌由来DNAポリメラーゼ、その変形であるクレノウ断片、サーマス アクアティカス (*Thermus aquaticus*) 由来DNAポリメラーゼ、バチルスカルドテナックス (*Bacillus caldolenax*) 由来DNAポリメラーゼ等がある。これらの酵素はその有する性質に応じて、DNAの標識化、PCR、DNA塩基配列決定等に利用されている。一般にDNAポリメラーゼはその起源による特異性を有しており、その特性を生かした利用法がある。ピロディクティウム オクルタム (*Pyrodicticum occultum*) は生育至適温度が約105℃である超高温性古細菌であり、この細菌由来のDNAポリメラーゼは高温で安定であることが予想されるため、遺伝子工学研究用試薬として有用な用途が期待される。ところが、該細菌は生育温度が非常に高い上に嫌気性であるのでその大量培養は困難である。したがって、該細菌の培養物からDNAポリメラーゼを直接大量に採取することは非常に困難である。一方、該細菌由来のDNAポリメラーゼの遺伝子については、アブストラクト オブジ アメリカン ソサイエティ フォー マイクロバイオロジー (Abstract of The American Society for Microbiology)、第93巻、第197頁(1993)に該細菌からDNAポリメラーゼ遺伝子が単離された旨が記載されている。しかしながら、803アミノ酸をコードし得るオープンリーディングフレームが存在するという以外に塩基配列等の該遺伝子を特定するに足る記載はなく、また、該DNAポリメラーゼを特定するに足るアミノ酸配列や酵素化学的性質の十分な記載もない。また、該細菌のその他のDNAポリメラーゼ遺伝子についても記載されていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、新規のDNAポリメラーゼ遺伝子を特定し、該遺伝子を含有させたプラスミドを保有する形質転換体を用いた新規DNAポリメラーゼの遺伝子工学的製造法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は配列表の配列番号1若しくは2で示されるアミノ酸配列、又はそれらの一部であって、かつ、DNAポリメラーゼ活性を有する部分をコードするDNAポリメラーゼ遺伝子に関する。本発明の第2の発明は第1の発明のDNAポリメラーゼ遺伝子に厳密な条件下でハイブリダイズ可能なDNAポリメラーゼ遺伝子に関する。本発明の第3の発明はDNAポリメラーゼの製造方法に関し、第1又は第2の発明のDNAポリメラーゼ遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体を培養し、該培養物から第1又は第2の発明のDNAポリメラーゼ遺伝子がコードするDNAポリメラーゼを採取することを特徴とする。

【0005】 本発明者らは鋭意研究の結果、ピロディクティウム オクルタムから2種の新規DNAポリメラーゼ遺伝子を見出し、これらをクローニングすることに成功した。更に、これらの遺伝子を導入した形質転換体を作製し、DNAポリメラーゼを大量生産することに成功し、本発明を完成した。

【0006】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明に使用する菌株としては、例えば、ピロディクティウム オクルタム DSM 2709[†] 株 [ドイッチェ ザムルンク フォン ミクロオルガニズメンウント ツェルクルチュウレン (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) GmbHの保存菌株: DSM 2709[†]] がある。

【0007】 本発明のDNAポリメラーゼ遺伝子は次に例示する工程により得ることができる。

(1) ピロディクティウム オクルタムからDNAを抽出する。

(2) α型DNAポリメラーゼに共通なアミノ酸配列を基に遺伝子増幅用オリゴヌクレオチドプライマーを作製し、(1)で得たDNAを鋳型としてPCRを行う。

(3) (1)で得たDNAを適当な制限酵素で切断し、これに対して(2)で得た増幅DNA断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行う。

(4) (3)で適当な陽性シグナルが得られた制限酵素で(1)のDNAを切断し、それぞれの切断部位に合うカセットをDNAリガーゼで結合させる。

(5) カセット内の共通プライマーとプローブに用いたDNA断片中に貼り付くプライマーを用いてPCRを行い、増幅されるDNA断片の制限酵素マッピングを行うことにより、DNAポリメラーゼ遺伝子を含む周辺領域

の制限酵素地図を作成する。

(6) (5)の結果を基にDNAポリメラーゼをコードする全領域を含む断片が得られる制限酵素で(1)のDNAを切断し、ベクターに結合させる。

(7) DNA断片を結合させたベクターを宿主菌に導入し、目的のDNA断片を含む形質転換体を選択する。

(8) (7)で得た形質転換体を培養し、培養菌体抽出物のDNAポリメラーゼ活性を確認する。

【0008】上記DNA供与体であるピロディクティウム オクルタム DSM2709由来DNAは、100℃で嫌気培養した該培養菌体より抽出する。抽出、精製、制限酵素による切断等は公知の方法を用いることができ、当該方法の詳細は1982年 コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス (T. Maniatis) ほか著、モレキュラー クローニング、ア ラボラトリー マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual) 第75～178頁に記載されている。

【0009】目的のDNA断片を選択する方法としては、例えば、公知のDNAポリメラーゼのアミノ酸配列を比較し、共通のアミノ酸配列を示す領域を基にPCR用のプライマーを作製する。これまでに知られている古細菌由来のDNAポリメラーゼは α 型であることから、例えば、公知の α 型DNAポリメラーゼのアミノ酸配列を比較して、共通の領域を基にしてミックスプライマーを作製することができる。 α 型DNAポリメラーゼをクローニングするためのプライマーとしては、特開平6-14780号公報に記載のGC型、AT型、若しくは中間型のプライマーを使用することができる。これらは目的のDNAのGC含量に応じて使い分けることができる。

【0010】ピロディクティウム オクルタムは、システマティック アンド アプライドマイクロバイオロジー (Systematic and Applied Microbiology)、第4巻、第535～551頁(1983)記載のようにGC含量が62%と高いことから、本発明者らは配列表の配列番号3及び4に示されるGC型のプライマーを用いてピロディクティウム オクルタムDNAを鋳型してPCRを行った。その結果、特異的なDNA断片が増幅されることを見出した。更に、この増幅DNA断片の塩基配列を決定したところ、その推定されるアミノ酸配列が公知のDNAポリメラーゼと相同性を有する2種類の配列が見出された。これら2種類の増幅DNA断片の塩基配列を配列表の配列番号5(配列Iと称する)及び配列番号6(配列IIと称する)に示す。このことから、ピロディクティウム オクルタムが少なくとも2種類のDNAポリメラーゼを有することが示唆された。

【0011】これらのDNAポリメラーゼをコードする遺伝子は、例えば該増幅DNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行うことにより選択することが

できる。ハイブリダイゼーションによる選択は公知の方法、例えば、前記モレキュラー クローニング、ア ラボラトリー マニュアル、第309頁(1982)に記載されている方法を用いることができる。サザンハイブリダイゼーション法により目的のDNAポリメラーゼ遺伝子がピロディクティウム オクルタムDNAのどの制限酵素断片上に存在するかを分析した後、適当な制限酵素部位を有するカセットをそれぞれの切断断片に結合させ、その反応液を一部とってカセット内の共通プライマーとプローブ内の領域に貼りつくプライマーとでPCRを行い、得られた増幅断片を制限酵素分析することによりDNAポリメラーゼ遺伝子を含む領域の制限酵素地図を求めることができる。この結果よりDNAポリメラーゼをコードする全領域を含む断片をクローニングすべくピロディクティウム オクルタムDNAを切断し、ベクターに組込む。プラスミドベクターとしては公知のものが使用でき、例えばpUC18、pUC19、pTV118N、pTV119Nなどが挙げられるがこれらに限定されるものではない。また組込ませる手段についても公知の方法が利用でき、DNAリガーゼを用いた酵素反応で組込ませればよい。

【0012】次いで組換えプラスミドを宿主大腸菌に導入させるが、宿主大腸菌としては、形質転換能を有するものであれば野生株、変異株のいずれも使用できるが、制限系変異株で修飾系野生株(r^{-} , m^{-})であることが望ましい。導入の手段自体は公知の方法、例えば前記モレキュラー クローニング、ア ラボラトリー マニュアル、第250頁(1982)を用いることができる。このようにして目的のDNA断片を宿主に導入させ、プラスミドベクターの特性、例えばpUC18の場合アンピシリン耐性を有するコロニーを選択することによりクローン化されたDNAの集団を調製することができる。

【0013】次に上記集団の中から目的の断片を有するクローンを選択する。選択の方法はベクターの種類によってコロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーションを用いればよく、方法自体は公知のものである。

【0014】本発明者らは、以上の方法で配列Iを有する増幅DNA断片(プローブI)をプローブとして約4.2 kbのDNA断片をクローニングした。その塩基配列の一部を配列表の配列番号7に示す。また、配列IIを有する増幅DNA断片(プローブII)をプローブとして約3.1 kbのDNA断片をクローニングした。その塩基配列の一部を配列表の配列番号8に示す。更に本発明者らはプローブIIを用いてクローニングした約3.1 kbの断片をpTV119Nに組込んだプラスミドを作成し、pPO500-IIと命名した。プラスミドpPO500-IIを有する大腸菌を培養し、菌体の粗抽出液を得た。該抽出液は90℃20分処理後も十分量のDNA

ポリメラーゼ活性を有し、発現ベクターのみを有する大腸菌粗抽出液ではこのような活性を有しないことより、pPO500-II上に耐熱性DNAポリメラーゼ産生情報が存在し、かつ、大腸菌内で該情報を有する遺伝子が発現していると結論した。pPO500-IIで形質転換された大腸菌JM109は*Escherichia coli* JM109/pPO500-IIと命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13659として寄託されている。

【0015】また、本発明者らは、プローブIを用いてクローニングした約4.2kbの断片をpTV118Nに組込んだプラスミドを作製し、pPO100-Iと命名した。プラスミドpPO100-Iを有する大腸菌を培養し、菌体の粗抽出液を得た。該抽出液は70℃20分処理後も十分量のDNAポリメラーゼ活性を有し、pPO100-I上に耐熱性DNAポリメラーゼ産生情報が存在し、かつ、大腸菌内で該情報を有する遺伝子が発現していると結論した。pPO100-Iで形質転換された大腸菌JM109は*Escherichia coli* JM109/pPO100-Iと命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13660として寄託されている。

【0016】また、得られたDNAポリメラーゼ遺伝子をプローブとして、厳密な条件下でハイブリダイゼーションを行えば、塩基配列は少し異なるが、実質的に同一である他のDNAポリメラーゼ遺伝子を得ることができる。

【0017】なお、かかる厳密な条件下とは、例えば、以下のとおりである。すなわち、DNAを固定したナイロン膜を、6×SSC(1×SSCは塩化ナトリウム8.76g、クエン酸ナトリウム4.41gを1リットルの水に溶かしたもの)、1%ラウリル硫酸ナトリウム、100μg/mlのサケ精子DNA、5×デンハルト(Denhardt's)(ウシ血清アルブミン、ポリビニルピロリドン、フィコールをそれぞれ0.1%の濃度で含む)を含む溶液中で65℃で20時間プローブとハイブリダイゼーションを行うことである。

【0018】これらの耐熱性DNAポリメラーゼの精製法としては、培養菌体より、例えば超音波処理、熱処理、フェニルセファロース カラム クロマトグラフィ、ヘパリンセファロース カラム クロマトグラフィ、モノ(Mono)Q(ファルマシア社)、モノS(ファルマシア社)の各処理を行い、該DNAポリメラーゼをほぼ単一のバンドとなるまで精製することができる。pPO500-II上のDNAポリメラーゼ遺伝子がコードする耐熱性DNAポリメラーゼは、SDS-PAGEで約9万ダルトンの分子量を示すポリペプチドであり、DNA合成活性及び5'→3', 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有していた。また、pPO100-I上のDNAポリメラーゼ遺伝子がコードする耐熱性DNAポ

リメラーゼは、SDS-PAGEで約9.5万ダルトンの分子量を示すポリペプチドであり、DNA合成活性及び5'→3', 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有していた。これらの耐熱性DNAポリメラーゼは遺伝子工学研究用試薬として有用である。

【0019】また、本発明によって古細菌から2種類のDNAポリメラーゼが見出されたことは、以下のような興味深い知見も提供する。すなわち、真核生物の系では複数個のDNAポリメラーゼがDNA複製に働いているということが提唱されており、リーディング鎖合成、ラギング鎖合成がそれぞれ別のDNAポリメラーゼによって行われている可能性が示唆されている。一方原核生物では大腸菌の系で解析が進んでおり、複製酵素であるDNAポリメラーゼIIIが知られている。この酵素は10種類もの異なるタンパク質の複合体で、複合体が2量体になるときの組合せによって非対称性が現れ、これがリーディング鎖とラギング鎖合成のメカニカルな違いを説明している。しかし、古細菌では、これまで真核細胞の持つDNAポリメラーゼαに構造が類似したDNAポリメラーゼを有することが知られているが、DNA複製のメカニズムは全くわかっていない。今回、本発明者らは、α型と構造的に同じファミリーに属する2種類のDNAポリメラーゼ遺伝子を見出した。真核細胞は古細菌に真正細菌が共生して進化したと考えられており、おそらく本発明者らが見出した2種類のα型DNAポリメラーゼ遺伝子それぞれは、真核生物のDNAポリメラーゼα、δ、ε、のうちの2種類のDNAポリメラーゼに相当するものと考えられる。超好熱性古細菌からDNA複製に関与すると思われる2種類のDNAポリメラーゼ遺伝子を単離したことは、生物の原始により近いDNA複製のメカニズムを解明する手がかりを提供するものである。古細菌のDNA複製メカニズムの解明は高等生物のDNA複製の研究に役立てることができる。

【0020】

【実施例】以下、実施例をもって本発明を更に詳細に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0021】実施例1

(1)ピロディクティウム オクルタム染色体DNAの調製

40 ピロディクティウム オクルタム DSM2709[†]をDSMの指定する条件により嫌氣的に培養した。150mlの培養から得た菌体を750μlの25%ショ糖、0.05M トリス-塩酸(pH8.0)に懸濁し、150μlの0.5M EDTA、75mlのリゾチム溶液(10mg/ml)を加えて20℃で1時間放置した。更に6mlのSET溶液(20mM トリス-塩酸pH8.0、1mM EDTA、150mM NaCl)を加えた後、375μlの10%SDSと75μlのプロテイナーゼK溶液(20mg/ml)を加えて、37℃で1時間放置した。フェノール抽出、クロロホル

ム抽出の後エタノール沈殿を行い、長鎖DNAを回収した。以上の操作により約7 μ gのDNAが得られた。

【0022】(2) PCRによる特異的DNAの増幅
配列表の配列番号3及び4に示す2種類のオリゴヌクレオチド(GC型プライマー1、2)を合成した。これらのプライマーをそれぞれ100pmolと実施例1-

(1)で調製した染色体DNA1ngを用いて全量100 μ lの系で94℃で1分、45℃で2分、72℃で2分の条件でPCRを50サイクル行った。反応液の5 μ lを取り、アガロースゲル電気泳動で分析した結果、約400bpのDNA断片が特異的に増幅していた。このDNA断片をSmaIで開裂したpUC118ベクターに組込んで塩基配列を決定した。その結果、2種類の配列が見出された。配列表の配列番号5(配列I)及び配列番号6(配列II)にその配列を示す。これらの配列はいずれも公知のDNAポリメラーゼの配列と相同性を有していた。

【0023】(3) ゲノミックサザン法によるDNAポリメラーゼ遺伝子の検索

実施例1-(1)で調製した染色体DNAを1つの制限酵素につき0.15 μ gを用いて、BamHI、EcoRI、HindIII、PstI、XbaIの5種類の制限酵素で分解してアガロースゲル電気泳動に供した。次いでアガロースゲル上のDNAをナイロン膜に移し、プローブIIを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブの標識はランダムプライミング法によって放射性標識した。ハイブリダイゼーションの条件は、5 \times SSC、0.1%SDS、5 \times デンハルツ液、100 μ g/ml 仔牛胸腺DNA中65℃で5時間行った。2 \times SSC、0.1%SDS、中で5.5℃1時間洗浄した後、イメージングプレート(富士フィルム社)に感光して、イメージアナライザーBAS-2000(富士フィルム社)で画像データを得た。その結果、BamHI、EcoRI、HindIII、PstI、XbaIでそれぞれ2.7kb、20kb、4.4kb、6.6kb、9.4kbの長さの位置に陽性シグナルを検出した。

【0024】(4) DNAポリメラーゼ遺伝子を含む領域の制限酵素地図の作成

実施例1-(1)で調製した染色体DNA0.3 μ gをBamHI、EcoRI、HindIII、又はPstIで切断した後、それぞれの切断部位を有するカセット(宝酒造社)各50ngをDNAリガーゼを用いて結合させた。この反応液からDNAをエタノール沈殿によって回収し、この一部を用いてPCRを行った。ネステッドPCRを行うために、あらかじめプローブIIの配列内で、GC型プライマー1、2(配列番号3、4)と同方向の特異的プライマーII-S1(配列番号11)、II-S2(配列番号12)を合成した。1回目のPCRはカセット中の配列に貼り付く配列表の配列番号9で示され

る共通のプライマー(カセットプライマーC1、宝酒造社)と配列番号3又は4で表されるプライマーを組合せて用いて行った。次にそのPCR溶液1mlを鋳型とし、配列表の配列番号10で表されるカセットプライマーC2(宝酒造社)とプライマーII-S1、又はII-S2の組合せでPCRを行った。増幅されたDNA断片をBamHI、HindIII、EcoRI、PstI、KpnI、XbaI、SmaI、SalIなどの制限酵素で切断して、制限酵素地図を作成した。図1にその制限酵素地図を示す。この制限酵素地図とPCRに用いたプライマーの位置から、PstI-KpnIの二重切断によって得られる約3.1kbの断片中にDNAポリメラーゼをコードする全領域が含まれていると推定した。

【0025】(5) DNAポリメラーゼ遺伝子を含むDNA断片のクローニング

実施例1-(1)で調製した染色体DNA4 μ gをPstIとKpnIで切断し、3.1kb付近のDNAをアガロースゲルから回収した。回収はスプレック(SUPREC)-01(宝酒造社)による遠心法を用いた。pTV119N(宝酒造社)をPstIとKpnIで切断して開裂したものを調製し、回収断片と混合してDNAリガーゼで結合させた。次に大腸菌JM109株に導入して得られた形質転換体の集団からプローブIIをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションによって目的のクローンを選択した。選択した形質転換体からプラスミドを回収し、目的のPstI-KpnI断片が導入されていることを確認し、該プラスミドをpPO500-IIと命名した。再度pPO500-IIを大腸菌JM109に導入して、Escherichia coli JM109/pPO500-II(FERM P-13659)を得た。更に、pPO500-IIにクローニングされているPstI-KpnI断片の塩基配列を決定した。その塩基配列を配列表の配列番号8に示す。その結果、803アミノ酸からなるオープンリーディングフレーム(ORF)が認められた。そのアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示す。

【0026】(6) 形質転換体の培養及び粗抽出液の調製

Escherichia coli JM109/pPO500-II(FERM P-13659)をアンピシリンが100 μ g/mlの濃度で存在するL培地5mlに接種し37℃で培養した。培養液の濁度が0.6(A₆₀₀)のとき、誘導物質であるイソプロピル β -D-チオガラクトシド(IPTG)を添加し更に15時間培養を行った。集菌後150 μ lの25%ショ糖、50mM トリス塩酸(pH7.6)、10mM NaCl、1mM 2-メルカプトエタノール、2 μ M フェニルメタンスルホンフルオリド(PMSF)に懸濁し、リゾチームを0.5mg/mlの濃度で加えて0℃30分静置、その後37℃に移し、更に30分静置した。凍結融解を一度行った後、遠心分離(14000rpm、10分)により上

清を得た。得られた上清について100℃15分の熱処理を行い、再度遠心分離(14000rpm、10分)を行って上清を回収し粗抽出液とした。

【0027】(7) DNAポリメラーゼ活性の測定
反応溶液として20mM トリス-塩酸(pH6.3、75℃)、2.5mM塩化マグネシウム、1mM 2-メルカプトエタノール、2μM(活性化)DNA、33μM dATP、dCTP、dGTP、TTP、60nM [³H] TTPを用意し、この溶液150μlに対して適量の粗抽出液を加え、75℃、5分反応させた後、50mM ピロリン酸、10%トリクロロ酢酸(TCA)を1ml加えて反応を停止させた。氷中で5分間静置した後、全量をガラスフィルターに移し、吸引ろ過した。10%TCAで数回洗浄した後、70%エタノールで置換し、フィルターを乾燥して液体シンチレーションカウンターでフィルター上の放射活性を測定した。1mlの培養液から3.0U単位のDNAポリメラーゼが得られた。

【0028】(8) プラスミドpPO500-IIを導入した大腸菌による耐熱性DNAポリメラーゼの生産
大腸菌JM109/pPO500-IIの培養液3リットルより得られた菌体4.2gを緩衝液(150mM トリス-塩酸pH7.6、2mM EDTA、2.4mM PMSF)40mlに懸濁し、超音波処理にて破碎した。最終濃度が0.2Mになるように、硫酸アンモニウムを加え遠心分離(12,000rpm、10分)した上清について90℃10分の熱処理を行い粗抽出液を得た。このA₂₈₀を測定し1000(A₂₈₀)に対し、5%ポリエチレンイミン(PEI)溶液(pH7.6)0.5mlを加え4℃で1時間かくはんした後、遠心分離(12,000rpm、20分)して除核酸を行い、その上清を緩衝液(50mMトリス-塩酸pH7.6、2mM EDTA、0.2M 硫酸アンモニウム)で平衡化したフェニルセファロース カラム(6FFHigh sub, ファルマシア社)1mlに添加した。緩衝液50mM トリス-塩酸pH7.6、2mM EDTA、緩衝液(50mM トリス-塩酸pH7.6、2mM EDTA、20%エチレングリコール)で順に洗浄した後、0M~4M尿素の直線濃度勾配で溶出して分画し、実施例1-(7)に従ってDNA活性ポリメラーゼ活性を調べた。次にその活性分画を集めて緩衝液(50mM トリス-塩酸pH7.6、100mM KCl、0.1mM EDTA、0.2%ツイーン(Tween)20)で平衡化したハイトラップ ヘパリン カラム(ファルマシア社)1mlに添加し150mM KCl、及び150mM~650mM KClの直線濃度勾配で溶出し、活性画分を集めた。活性画分は、緩衝液(50mM トリス-塩酸pH7.6、0.1mM EDTA、0.2%ツイーン20)で透析し、同じ緩衝液で平衡化したモノQ(5ml)に供し、未吸着画分を同じ緩衝

液で平衡化したモノS(5ml)に添加して0mM~500mM NaCl直線濃度勾配で溶出し活性画分を集めた。モノS画分より2200U酵素標品(PocDNAポリメラーゼII)を得、SDS-PAGE分析したところ、分子量約9万ダルトンの単一バンドを与えた。

【0029】(9) 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の測定

pUC119をSspIで切断後アガロースゲルにて電気泳動し386bpの断片をスプレック-01(宝酒造社)を用いて回収した。この断片の5'末端を[γ-³²P]ATPとメガラベルキット(宝酒造社)を用いて放射性標識し、NICKカラム(G50)(ファルマシア社)でゲルろ過して遊離の[γ-³²P]ATPを除いて基質とした。この基質1ngと実施例1-(8)で得たPocDNAポリメラーゼII 0.05Uを20mM トリス-塩酸(pH6.3、又はpH7.7)、2.5mM MgCl₂溶液10μl中で75℃5分、10分、15分反応後エタノール25μlと20μg/μlグリコーゲン2μlを加えてエタノール沈殿を行い、その上清及び沈殿の放射活性をチェレンコフ法により液体シンチレーションカウンターで測定した。PocDNAポリメラーゼIIを加えた場合、時間と共に5'末端のヌクレオチドの遊離に伴う上清の放射活性の上昇があり、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性が認められた。一方JM109大腸菌破碎液を加えた場合、放射活性の上昇はなく、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性は認められなかった。

【0030】(10) 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の測定

pUC119をSau3AIで切断後アガロースゲルにて電気泳動し341bpの断片をスプレック-01(宝酒造社)を用いて回収した。この断片の3'末端を[α-³²P]dCTP、dATP、dGTP、dTTPとクレノウ酵素を用いて放射性標識し、NICKカラムでゲルろ過して遊離の[α-³²P]dCTPを除いて基質とした。この基質4ngを20mM トリス-塩酸(pH6.3、又はpH7.7)、2.5mM MgCl₂、1.25mg/mlのλ-HaeIII分解物の溶液10μl中でPocDNAポリメラーゼII 0.2U(pH6.3)又は0.05U(pH7.7)と75℃5分、10分、15分反応後実施例1-(9)と同様にエタノール沈殿を行い上清と沈殿の放射活性を測定した。反応は1.25mg/mlのλ-HaeIII分解物を加えることによりKmに対して基質大過剰の条件で行った。その結果、PocDNAポリメラーゼを加えた場合、時間と共に3'末端のヌクレオチドの遊離に伴う上清の放射活性の上昇があり、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が認められた。一方JM109大腸菌破碎液を加えた場合は放射活性の上昇はなく、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性は認められなかった。また、DNAポ

リメラーゼ活性に対する3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の割合を調べた結果、pH6.3の場合よりもpH7.7の場合の方が高く、約40倍であった。

【0031】実施例2

(1) DNAポリメラーゼ遺伝子を含むDNA断片のクローニング

プローブIを用いて実施例1-(3)と同様にしてザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、約5.5 kbのEcoRI断片、約4.9 kbのHind III断片、及び約1.7 kbのPst I断片が陽性を示した。プローブIの配列内でGC型プライマー1、2と同方向に特異的プライマーI-S1(配列番号13)、I-S2(配列番号14)を合成し、実施例1-(4)と同様にPCRを行って制限酵素地図を作成した。図2にその制限酵素地図を示す。制限酵素地図とPCRに用いたプライマーの位置から約4.2 kbのEcoRI-Hind III断片上にDNAポリメラーゼをコードする全領域が含まれていると推定した。次にpTV118N(宝酒造社)をEcoRIとHind IIIで開裂したものを選択し、実施例1-(5)と同様にして目的のクローンを選択した。得られた組換え体よりプラスミドを回収し、目的のEcoRI-Hind III断片が挿入されていることを確認し、該プラスミドをpPO100-Iと命名した。再度pPO100-Iを大腸菌JM109に導入して、Escherichia coli JM109/pPO100-I(FERM P-13660)を得た。更に、pPO100-IにクローニングされているEcoRI-Hind III断片のうち、Sma I-Hind III領域の塩基配列を決定した。その塩基配列を配列表の配列番号7に示す。その結果、塩基番号435~3176、540~3176にそれぞれ914、879アミノ酸からなるORFが認められた。914アミノ酸からなるORFのアミノ酸配列を、配列表の配列番号1に示す。879アミノ酸からなるORFは、配列番号1のうちアミノ酸番号36~914に相当する。

【0032】(2) 形質転換体の培養及び粗抽出液の調製

E. coli JM109/pPO100-Iをアンピシリンが100 µg/mlの濃度で存在するL培地5 mlに植菌し37℃で20時間培養し、集菌後200 µlの25%ショ糖、50 mM トリス-塩酸(pH7.6)、10 mM NaCl、1 mM 2-メルカプトエタノール、2 µM PMSFに懸濁し、リゾチームを0.5 mg/mlの濃度で加えて0℃30分静置、その後37℃に移し更に30分静置した。凍結融解を一度行った後遠心分離(14000 rpm、10分)により上清を得た。得られた上清について70℃20分の熱処理を行い再度遠心分離(14000 rpm、10分)を行って上清を回収し粗酵素液とした。実施例1-(7)と同様にしてDNAポリメラーゼ活性を測定したところ1 mlの

培養液から0.22単位の活性が得られた。

【0033】(3) 発現系の改変

発現量上げるためにベクターpET15b(ノバジェン社)のNco I部位のATGよりDNAポリメラーゼが直接発現するプラスミドを構築した。最初に公知のαタイプのDNAポリメラーゼとのホモロジーより開始コドンと推定される2ヵ所のATGの領域(配列番号7の塩基番号435~437と540~542)にそれぞれNco Iサイトを導入するためのオリゴヌクレオチド1、2(配列番号15、16)を合成した。このオリゴヌクレオチド1、又は2とpPO100-I、ミュータン(Mutan)-K(宝酒造社)を用いてサイトダイレクトミュータジェネシスを行いpPO100-IにNco Iサイトを導入したプラスミドpPO100-IM1、pPO100-IM2を構築した。次にそれぞれのプラスミドによりNco I-Afl II(1551 bpと1446 bp)断片とAfl II-EcoRV(1457 bp)断片を精製し(Afl IIサイトは配列番号7の塩基番号1983~1988にある)、pET-15bをBamHIで切断後を平滑末端化し、更にNco Iで切断して得られるpET-15bNco I-BamHI平滑化断片と混合しDNAリガーゼにより結合させた。それぞれの混合液を用いて大腸菌HB101を形質転換し、得られた形質転換体よりプラスミドを調製し、制限酵素解析よりNco I-Afl II断片とAfl II-EcoRV断片が連結したプラスミドを選別しpPO200-IとpPO300-Iと命名した。すなわち、pPO200-Iは914アミノ酸(配列番号1。ただし、2番目のアミノ酸はLysからGluに置換されている)、及び879アミノ酸(配列番号1のアミノ酸番号36~914)からなる2つのORFを含んでおり、pPO300-Iは879アミノ酸(配列番号1のアミノ酸番号36~914)からなる1つのORFを含んでいる。

【0034】(4) プラスミドpPO200-I、pPO300-Iを導入した大腸菌による耐熱性DNAポリメラーゼの生産

大腸菌HMS174(DE3)(ノバジェン社)にプラスミドpPO200-I又はpPO300-Iを導入した形質転換体をそれぞれHMS174(DE3)/pPO200-I、HMS174(DE3)/pPO300-Iと命名した。HMS174(DE3)/pPO200-IとHMS174(DE3)/pPO300-Iをそれぞれ2リットルのバッフル付フラスコで500 mlのL培地に植菌し濃度が0.7のとき1 M IPTGを0.2 ml加え20時間培養した。培養液3リットルより得られた菌体4.4 gと4.3 gより実施例1-(8)と同様にしてDNAポリメラーゼを精製した。HMS174(DE3)/pPO200-Iからはヘパリン活性画分より11250 U得られSDS-PAGEで

ほぼ等量の分子量約9.5万ダルトンと10万ダルトンの2バンドを与えた。HMS174 (DE3) / pPO300-Iからはヘパリン活性画分より13350U得られ、SDS-PAGEで分子量約9.5万ダルトンの単一バンドを与えた。

【0035】HMS174 (DE3) / pPO300-Iより精製して得られた酵素標品 (PocDNAポリメラーゼI) を用いて実施例1-(9)、1-(10)と同様の方法で付随するヌクレアーゼ活性の有無を調べた。5'→3'エキソヌクレアーゼに関してはPocDNAポリメラーゼII同様活性が認められた。既知の α 型古細菌株由来の酵素であるピロコッカス フリオサス (*P. furiosus*) 由来のDNAポリメラーゼ (PfuDNAポリメラーゼ、ストラタジーン社) にはこの活性は認められなかった。3'→5'エキソヌクレアーゼに関しては、PocDNAポリメラーゼII同様活性が認められpH6.3よりpH7.7の反応液においてより約7倍高い活性を示した。DNAポリメラーゼ活性に対する3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の割合はpH6.3の反応液でPocDNAポリメラーゼIIの数10倍、PfuDNAポリメラーゼの約3.5倍、pH7.7の反応液でPocDNAポリメラーゼIIの約1.4倍、PfuDNAポリメラーゼの約1.5倍であった。

【0036】3'→5'エキソヌクレアーゼ活性はDN

配列:

Met	Lys	Ala	Gln	Pro	Gln	Leu	Ala	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Thr	Thr
1				5					10					15
Glu	Lys	Ala	Val	Val	Asn	Val	Asp	Ala	Glu	Thr	Trp	Ala	Glu	Gln
				20					25					30
His	Ala	Trp	Ser	Thr	Met	Val	Pro	Gln	Ser	Ser	Thr	Pro	Pro	Ala
				35					40					45
Gly	Tyr	Gly	Asp	Asp	Leu	Ala	Gly	Lys	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly
				50					55					60
Gly	Ser	Arg	Gly	Ala	Leu	Glu	Arg	Leu	Ser	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr
				65					70					75
Arg	Lys	Pro	Leu	Glu	Ala	Arg	Asp	Gly	Val	Glu	Gly	Phe	Leu	Leu
				80					85					90
Gln	Thr	Met	Tyr	Asp	Gly	Glu	Arg	Gly	Val	Ala	Ala	Ala	Lys	Ile
				95					100					105
Tyr	Asp	Asp	Arg	Asn	Gly	Ile	Val	Tyr	Val	Tyr	Phe	Asp	Arg	Thr
				110					115					120
Gly	Tyr	Met	Pro	Tyr	Phe	Leu	Thr	Asp	Ile	Pro	Pro	Asp	Lys	Leu
				125					130					135
Gln	Glu	Leu	His	Glu	Val	Val	Arg	His	Lys	Gly	Phe	Asp	His	Val
				140					145					150
Glu	Val	Val	Glu	Lys	Phe	Asp	Leu	Leu	Arg	Trp	Gln	Arg	Arg	Lys
				155					160					165
Val	Thr	Lys	Ile	Val	Val	Lys	Thr	Pro	Asp	Val	Val	Arg	Val	Leu
				170					175					180
Arg	Asp	Lys	Val	Pro	Arg	Ala	Trp	Glu	Ala	Asn	Ile	Lys	Phe	His

Aポリメラーゼの有するDNA合成時の校正機能と考えられ、鋳型DNAに対して誤った塩基を取り込んで合成してしまったとき、これを切り離し、改めて正しい塩基を取り込む過程で大切な活性である。本発明におけるPocDNAポリメラーゼIのポリメラーゼ活性に対するエキソヌクレアーゼ活性の比率が、本発明のPocDNAポリメラーゼIIや既知のPfuDNAポリメラーゼの持つそれぞれの活性の比と比べて明らかに高いということはPocDNAポリメラーゼIが非常に高い正確性を持ったDNA合成を行うことを示唆している。

【0037】

【発明の効果】本発明により、遺伝子工学研究用試薬として有用な耐熱性DNAポリメラーゼをコードする遺伝子、及び該遺伝子を用いた耐熱性DNAポリメラーゼの遺伝子工学的製造方法が提供された。

【0038】

【配列表】

【0039】配列番号:1

配列の長さ:914

20 配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

	185	190	195
His Asn Tyr Ile Tyr Asp Tyr Gly Leu Val, Pro Gly Met Lys Tyr			
	200	205	210
Arg Val Gly Lys Gly Arg Leu Ile Leu Leu Gly Gly Glu Ala Ser			
	215	220	225
Gly Asp Asp Glu Arg His Ile Arg Glu Ile Phe Ser Gly Glu Asp			
	230	235	240
Glu Ser Thr Ile Glu Met Ala Val Lys Trp Leu Ser Leu Phe Glu			
	245	250	255
Gln Pro Pro Pro Lys Pro Arg Arg Leu Ala Val Asp Ile Glu Val			
	260	265	270
Phe Thr Pro Phe Lys Gly Arg Ile Pro Asp Pro Ser Thr Ala Ser			
	275	280	285
Tyr Pro Val Ile Ser Val Ala Met Ser Ser Asp Glu Gly Trp Arg			
	290	295	300
Ala Val Tyr Val Leu Ala Arg Pro Gly Val Pro Met Asn Pro Pro			
	305	310	315
Arg Gly Pro Leu Pro Glu Asn Leu His Val Glu Ile Phe Asp Asp			
	320	325	330
Glu Arg Ala Leu Ile Leu Glu Ala Phe Arg Leu Ile Ser Asn Tyr			
	335	340	345
Pro Val Leu Leu Thr Phe Asn Gly Asp Asn Phe Asp Leu Pro Tyr			
	350	355	360
Leu Tyr Asn Arg Ala Val Lys Leu Gly Ile Pro Arg Glu Tyr Ile			
	365	370	375
Pro Phe Arg Ala Arg Ser Asp Tyr Val Thr Leu Glu Tyr Gly Phe			
	380	385	390
His Ile Asp Leu Tyr Lys Phe Phe Ser Thr Lys Ala Val Glu Ala			
	395	400	405
Tyr Ala Phe Gly Asn Ala Tyr Gln Glu Phe Thr Leu Asp Ala Ile			
	410	415	420
Ala Ser Ala Leu Leu Gly Glu His Lys Val Glu Val Glu Ser Thr			
	425	430	435
Val Ser Asp Leu Pro Phe Phe Glu Leu Val Arg Tyr Asn Val Arg			
	440	445	450
Asp Ala Asp Leu Thr Leu Arg Leu Thr Thr Phe Asn Asn Asp Leu			
	455	460	465
Val Trp Ser Leu Ile Ile Leu Leu Met Arg Ile Ser Lys Leu Pro			
	470	475	480
Leu Glu Asp Val Thr Arg Ser Gln Val Ser Ala Trp Val Lys Ser			
	485	490	495
Leu Phe Tyr Trp Glu His Arg Arg Arg Gly Tyr Leu Ile Pro Ser			
	500	505	510
Arg Glu Glu Ile Ile Arg Leu Lys Gly Thr Thr Arg Ser Glu Ala			
	515	520	525
Leu Ile Lys Gly Lys Lys Tyr Gln Gly Ala Leu Val Leu Asp Pro			
	530	535	540
Pro Ser Gly Ile Tyr Phe Asn Ile Val Val Leu Asp Phe Ala Ser			
	545	550	555
Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Lys Arg Trp Asn Leu Ser Tyr Glu Thr			

(10)

特開平7-327684

17

18

	560	565	570
Val Asn Pro Val Tyr Cys Pro Glu Ser Lys Leu Val Glu Val Pro			
	575	580	585
Asp Val Gly His Lys Val Cys Met Ser Ile Pro Gly Leu Thr Ser			
	590	595	600
Gln Ile Val Gly Leu Leu Arg Asp Tyr Arg Val Lys Ile Tyr Lys			
	605	610	615
Lys Lys Ala Lys Asp Lys Ser Leu Pro Asp Asp Val Arg Ala Trp			
	620	625	630
Tyr Asn Thr Val Gln Ala Ala Met Lys Val Tyr Ile Asn Ala Ser			
	635	640	645
Tyr Gly Val Phe Gly Ala Glu Ser Phe Pro Phe Tyr Ala Pro Pro			
	650	655	660
Val Ala Glu Ser Val Thr Ala Ile Gly Arg Tyr Thr Ile Lys Gln			
	665	670	675
Thr Leu Gln Lys Ala Gly Glu Leu Gly Leu Arg Val Leu Tyr Gly			
	680	685	690
Asp Thr Asp Ser Leu Phe Ile Trp Asn Pro Asp Glu Asp Lys Leu			
	695	700	705
Arg Glu Leu Gln Glu Tyr Val Glu Lys Asn Phe Gly Leu Asp Leu			
	710	715	720
Glu Val Asp Lys Val Tyr Lys Phe Val Thr Phe Ser Gly Leu Lys			
	725	730	735
Lys Asn Tyr Ile Gly Ala Tyr Glu Asp Gly Ser Ile Asp Val Lys			
	740	745	750
Gly Met Val Ala Lys Lys Arg Asn Thr Pro Glu Phe Leu Lys Lys			
	755	760	765
Glu Phe Ser Glu Met Leu Ala Val Ile Gly Ser Val Lys Ser Pro			
	770	775	780
Glu Asp Phe Ile Lys Val Arg Arg Val Ile Arg Glu Arg Leu Arg			
	785	790	795
Lys Val Tyr His Gly Leu Arg Asp Leu Glu Phe Asn Leu Asp Glu			
	800	805	810
Leu Ala Ile Arg Met Ala Leu Asn Lys Pro Val Glu Ala Tyr Thr			
	815	820	825
Lys Asn Thr Pro Gln His Val Lys Ala Ala Arg Gln Leu Ile Arg			
	830	835	840
Ala Gly Val Gln Val Leu Pro Gly Asp Val Ile Ser Phe Val Lys			
	845	850	855
Val Lys Gly Lys Glu Gly Val Lys Pro Val Gln Leu Ala Arg Leu			
	860	865	870
Pro Glu Val Asp Val Glu Lys Tyr Val Glu Ser Met Arg Asn Val			
	875	880	885
Phe Glu Gln Leu Leu Leu Ala Ile Ser Met Ser Trp Asp Glu Ile			
	890	895	900
Ile Gly Ser Ser Arg Leu Glu Ala Phe Phe Ser Arg Arg Gly			
	905	910	

【0040】配列番号:2

配列の長さ:803

配列の型:アミノ酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

50 配列の種類:ペプチド

配列：

Met Thr Glu Thr Ile Glu Phe Val Leu Leu Asp Ser Ser Tyr Glu		
1	5	10
Ile Leu Gly Lys Glu Pro Val Val Ile Leu Trp Gly Ile Thr Leu		
	20	25
Asp Gly Lys Arg Val Val Leu Leu Asp His Arg Phe Arg Pro Tyr		
	35	40
Phe Tyr Ala Leu Ile Ala Arg Gly Tyr Glu Asp Met Val Glu Glu		
	50	55
Ile Ala Ala Ser Ile Arg Arg Leu Ser Val Val Lys Ser Pro Ile		
	65	70
Ile Asp Ala Lys Pro Leu Asp Lys Arg Tyr Phe Gly Arg Pro Arg		
	80	85
Lys Ala Val Lys Ile Thr Thr Met Ile Pro Glu Ser Val Arg His		
	95	100
Tyr Arg Glu Ala Val Lys Lys Ile Glu Gly Val Glu Asp Ser Leu		
	110	115
Glu Ala Asp Ile Arg Phe Ala Met Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Arg		
	125	130
Leu Tyr Pro Phe Thr Val Tyr Arg Ile Pro Val Glu Asp Ala Gly		
	140	145
Arg Asn Pro Gly Phe Arg Val Asp Arg Val Tyr Lys Val Ala Gly		
	155	160
Asp Pro Glu Pro Leu Ala Asp Ile Thr Arg Ile Asp Leu Pro Pro		
	170	175
Met Arg Leu Val Ala Phe Asp Ile Glu Val Tyr Ser Arg Arg Gly		
	185	190
Ser Pro Asn Pro Ala Arg Asp Pro Val Ile Ile Val Ser Leu Arg		
	200	205
Asp Ser Glu Gly Lys Glu Arg Leu Ile Glu Ala Glu Gly His Asp		
	215	220
Asp Arg Arg Val Leu Arg Glu Phe Val Glu Tyr Val Arg Ala Phe		
	230	235
Asp Pro Asp Ile Ile Val Gly Tyr Asn Ser Asn His Phe Asp Trp		
	245	250
Pro Tyr Leu Met Glu Arg Ala Arg Arg Leu Gly Ile Lys Leu Asp		
	260	265
Val Thr Arg Arg Val Gly Ala Glu Pro Thr Thr Ser Val Tyr Gly		
	275	280
His Val Ser Val Gln Gly Arg Leu Asn Val Asp Leu Tyr Asp Tyr		
	290	295
Ala Glu Glu Met Pro Glu Ile Lys Met Lys Thr Leu Glu Glu Val		
	305	310
Ala Glu Tyr Leu Gly Val Met Lys Lys Ser Glu Arg Val Ile Ile		
	320	325
Glu Trp Trp Arg Ile Pro Glu Tyr Trp Asp Asp Glu Lys Lys Arg		
	335	340
Gln Leu Leu Glu Arg Tyr Ala Leu Asp Asp Val Arg Ala Thr Tyr		
	350	355
Gly Leu Ala Glu Lys Met Leu Pro Phe Ala Ile Gln Leu Ser Thr		

	365	370	375
Val Thr Gly Val Pro Leu Asp Gln Val Gly Ala Met Gly Val Gly			
	380	385	390
Phe Arg Leu Glu Trp Tyr Leu Met Arg Ala Ala Tyr Asp Met Asn			
	395	400	405
Glu Leu Val Pro Asn Arg Val Glu Arg Arg Gly Glu Ser Tyr Lys			
	410	415	420
Gly Ala Val Val Leu Lys Pro Leu Lys Gly Val His Glu Asn Val			
	425	430	435
Val Val Leu Asp Phe Ser Ser Met Tyr Pro Ser Ile Met Ile Lys			
	440	445	450
Tyr Asn Val Gly Pro Asp Thr Ile Val Asp Asp Pro Ser Glu Cys			
	455	460	465
Pro Lys Tyr Gly Gly Cys Tyr Val Ala Pro Glu Val Gly His Arg			
	470	475	480
Phe Arg Arg Ser Pro Pro Gly Phe Phe Lys Thr Val Leu Glu Asn			
	485	490	495
Leu Leu Lys Leu Arg Arg Gln Val Lys Glu Lys Met Lys Glu Phe			
	500	505	510
Pro Pro Asp Ser Pro Glu Tyr Arg Leu Tyr Asp Glu Arg Gln Lys			
	515	520	525
Ala Leu Lys Val Leu Ala Asn Ala Ser Tyr Gly Tyr Met Gly Trp			
	530	535	540
Ser His Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Arg Cys Ala Glu Ala Val Thr			
	545	550	555
Ala Trp Gly Arg Asn Leu Ile Leu Thr Ala Ile Glu Tyr Ala Arg			
	560	565	570
Lys Leu Gly Leu Lys Val Ile Tyr Gly Asp Thr Asp Ser Leu Phe			
	575	580	585
Val Val Tyr Asp Lys Glu Lys Val Glu Lys Leu Ile Glu Phe Val			
	590	595	600
Glu Lys Glu Leu Gly Phe Glu Ile Lys Ile Asp Lys Ile Tyr Lys			
	605	610	615
Lys Val Phe Phe Thr Glu Ala Lys Lys Arg Tyr Val Gly Leu Leu			
	620	625	630
Glu Asp Gly Arg Ile Asp Ile Val Gly Phe Glu Ala Val Arg Gly			
	635	640	645
Asp Trp Cys Glu Leu Ala Lys Glu Val Gln Glu Lys Ala Ala Glu			
	650	655	660
Ile Val Leu Asn Thr Gly Asn Val Asp Lys Ala Ile Ser Tyr Ile			
	665	670	675
Arg Glu Val Ile Lys Gln Leu Arg Glu Gly Lys Val Pro Ile Thr			
	680	685	690
Lys Leu Ile Ile Trp Lys Thr Leu Ser Lys Arg Ile Glu Glu Tyr			
	695	700	705
Glu His Asp Ala Pro His Val Met Ala Ala Arg Arg Met Lys Glu			
	710	715	720
Ala Gly Tyr Glu Val Ser Pro Gly Asp Lys Val Gly Tyr Val Ile			
	725	730	735
Val Lys Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Arg Ala Tyr Pro Tyr Phe			

(13)

特開平7-327684

23

24

	740	745	750
Met Val Asp Pro Ser Thr Ile Asp Val Asn Tyr Tyr Ile Asp His			
	755	760	765
Gln Ile Val Pro Ala Ala Leu Arg Ile Leu Ser Tyr Phe Gly Val			
	770	775	780
Thr Glu Lys Gln Leu Lys Ala Ala Ala Thr Val Gln Arg Ser Leu			
	785	790	795
Phe Asp Phe Phe Ala Ser Lys Lys			
	800		

【0041】配列番号:3

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

WSSYTSTACC CSWSSATCAT 20

【0042】配列番号:4

配列の長さ:20

配列の型:核酸

10 鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

TCNGTRTCNC CRTARATNAC 20

【0043】配列番号:5

配列の長さ:416

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

20

配列:

AGC CTG TAC CCC AGT ATC ATA AAG AGG TGG AAC CTA AGC TAC GAG	45
Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Lys Arg Trp Asn Leu Ser Tyr Glu	
1 5 10 15	
ACC GTA AAC CCC GTA TAC TGC CCC GAA TCG AAG CTA GTG GAG GTT	90
Thr Val Asn Pro Val Tyr Cys Pro Glu Ser Lys Leu Val Glu Val	
20 25 30	
CCC GAT GTA GGG CAT AAG GTG TGC ATG AGC ATA CCC GGC CTG ACC	135
Pro Asp Val Gly His Lys Val Cys Met Ser Ile Pro Gly Leu Thr	
35 40 45	
TCG CAG ATA GTT GGC CTG CTT AGG GAC TAT CGA GTC AAG ATA TAC	180
Ser Gln Ile Val Gly Leu Leu Arg Asp Tyr Arg Val Lys Ile Tyr	
50 55 60	
AAG AAG AAG GCC AAG GAT AAG AGT CTG CCG GAT GAT GTT AGA GCA	225
Lys Lys Lys Ala Lys Asp Lys Ser Leu Pro Asp Asp Val Arg Ala	
65 70 75	
TGG TAT AAT ACA GTC CAG GCA GCC ATG AAG GTG TAT ATA AAT GCC	270
Trp Tyr Asn Thr Val Gln Ala Ala Met Lys Val Tyr Ile Asn Ala	
80 85 90	
AGC TAT GGA GTC TTC GGG GCC GAG AGC TTC CCG TTC TAC GCG CCG	315
Ser Tyr Gly Val Phe Gly Ala Glu Ser Phe Pro Phe Tyr Ala Pro	
95 100 105	
CCG GTA GCG GAG AGC GTC ACA GCC ATA GGC AGG TAT ACT ATC AAG	360
Pro Val Ala Glu Ser Val Thr Ala Ile Gly Arg Tyr Thr Ile Lys	
110 115 120	
CAG ACG CTG CAG AAG GCT GGC GAA CTA GGG CTC CGC GTG ATC TAT	405
Gln Thr Leu Gln Lys Ala Gly Glu Leu Gly Leu Arg Val Leu Tyr	
125 130 135	
GCC GAT ACG GA	416
Gly Asp Thr	

(14)

特開平7-327684

25

26

【0044】配列番号:6

*鎖の数:二本鎖

配列の長さ:422

トポロジー:直鎖状

配列の型:核酸

*

配列:

TCC ATG TAC CCG AGC ATA ATG ATA AAG TAC AAC GTG GGC CCC GAC	45
Ser Met Tyr Pro Ser Ile Met Ile Lys Tyr Asn Val Gly Pro Asp	
1 5 10 15	
ACT ATA GTC GAC GAC CCC TCG GAG TGC CCA AAG TAC GGC GGC TGC	90
Thr Ile Val Asp Asp Pro Ser Glu Cys Pro Lys Tyr Gly Gly Cys	
20 25 30	
TAT GTA GCC CCC GAG GTC GGG CAC CGG TTC CGT CGC TCC CCG CCA	135
Tyr Val Ala Pro Glu Val Gly His Arg Phe Arg Arg Ser Pro Pro	
35 40 45	
GGC TTC TTC AAG ACC GTG CTC GAG AAC CTA CTG AAG CTA CGC CGA	180
Gly Phe Phe Lys Thr Val Leu Glu Asn Leu Leu Lys Leu Arg Arg	
50 55 60	
CAG GTA AAG GAG AAG ATG AAG GAG TTT CCG CCT GAC AGC CCC GAG	225
Gln Val Lys Glu Lys Met Lys Glu Phe Pro Pro Asp Ser Pro Glu	
65 70 75	
TAC AGG CTC TAC GAT GAG CGC CAG AAG GCG CTC AAG GTT CTT GCG	270
Tyr Arg Leu Tyr Asp Glu Arg Gln Lys Ala Leu Lys Val Leu Ala	
80 85 90	
AAC GCG AGC TAT GGC TAC ATG GGG TGG AGC CAT GCC CGC TGG TAC	315
Asn Ala Ser Tyr Gly Tyr Met Gly Trp Ser His Ala Arg Trp Tyr	
95 100 105	
TGC AAA CGC TGC GCC GAG GCT GTC ACA GCC TGG GGC CGT AAC CTT	360
Cys Lys Arg Cys Ala Glu Ala Val Thr Ala Trp Gly Arg Asn Leu	
110 115 120	
ATA CTG ACA GCT ATC GAG TAT GCC AGG AAG CTC GGC CTA AAG GTG	405
Ile Leu Thr Ala Ile Glu Tyr Ala Arg Lys Leu Gly Leu Lys Val	
125 130 135	
ATA TAT GGG TAC ACC GA	422
Ile Tyr Gly Asp Thr	
140	

【0045】配列番号:7

配列の種類: Genomic DNA

配列の長さ:3437

起源:

配列の型:核酸

生物名:ピロディクティウム オクルタム (Pyrodicti
um occultum)

鎖の数:二本鎖

株名: DSM2709

トポロジー:直鎖状

配列:

CCCGGGCCAC TCCATCCATA GGCTCAAGGC GCTCCAGGCT CCTTTTAAAC ATTACATGCA	60
ATTCTAAGGG ACTCTGCGCG CGGCTTAGGT CACCCACCTT ATACGGTGAT ACGTGGGAGC	120
TGGATAGGGG GCGGTGCGTG GTTAGGCGCT CAAAGAGGCG TGGAGGGGAG CGCGACCTAC	180
TCGAGTTCCT AGCTGGTGGC GTAACCGCG CCGCAGGGC TAAGGGCCGA ACCACCGAGA	240
GCGGGGATGG TACGGGCAGC GAGAGGGATG GTGCTAAGCC CCTCTGGGAG GGGGAATACGG	300
CCAGGAGGGC CGGGGTGGAG AGGCTATACG ATAACAGCCT CTACGAAC TGATCGGAAA	360
TATCCTCATC TAGGAGACGC GGCTTAGCC ATCCAAGAGA CGATGATCGG GAGGGGGCTG	420
ATCTCACTGG CGGC ATG AAG GCT CAG CCG CAG CTT GCT ACG CAC CAA GGG	470
Met Lys Ala Gln Pro Gln Leu Ala Thr His Gln Gly	
1 5 10	

(15)

特開平7-327684

27	CTA ACG ACA GAG AAG GCC GTG GTG AAC GTG GAT GCA GAA ACC TGG	28	515
	Leu Thr Thr Glu Lys Ala Val Val Asn Val Asp Ala Glu Thr Trp		
	15 20 25		
	GCT GAG CAG CAT GCA TGG AGC ACT ATG GTG CCT CAG AGC TCT ACG		560
	Ala Glu Gln His Ala Trp Ser Thr Met Val Pro Gln Ser Ser Thr		
	30 35 40		
	CCC CCC GCG GGG TAT GGA GAT GAT CTG GCA GGG AAG CTG GGT TCG		605
	Pro Pro Ala Gly Tyr Gly Asp Asp Leu Ala Gly Lys Leu Gly Ser		
	45 50 55		
	CTG CTA GGG GGC TCA CGG GGT GCC CTT GAG AGA CTT TCC GCT CTC		650
	Leu Leu Gly Gly Ser Arg Gly Ala Leu Glu Arg Leu Ser Ala Leu		
	60 65 70		
	CCG CTT ACG CGC AAA CCC CTG GAA GCG CGT GAT GGG GTT GAG GGT		695
	Pro Leu Thr Arg Lys Pro Leu Glu Ala Arg Asp Gly Val Glu Gly		
	75 80 85		
	TTC CTG CTT CAA ACA ATG TAT GAC GGG GAG AGG GGT GTT GCG GCG		740
	Phe Leu Leu Gln Thr Met Tyr Asp Gly Glu Arg Gly Val Ala Ala		
	90 95 100		
	GCT AAG ATA TAT GAC GAC CGT AAT GGC ATT GTC TAC GTC TAC TTT		785
	Ala Lys Ile Tyr Asp Asp Arg Asn Gly Ile Val Tyr Val Tyr Phe		
	105 110 115		
	GAT AGG ACT GGT TAC ATG CCA TAC TTT CTA ACC GAT ATA CCA CCG		830
	Asp Arg Thr Gly Tyr Met Pro Tyr Phe Leu Thr Asp Ile Pro Pro		
	120 125 130		
	GAC AAG CTG CAG GAG CTT CAC GAG GTG GTG CGG CAT AAG GGG TTC		875
	Asp Lys Leu Gln Glu Leu His Glu Val Val Arg His Lys Gly Phe		
	135 140 145		
	GAC CAT GTT GAG GTT GTG GAG AAG TTT GAT CTC CTG CGT TGG CAG		920
	Asp His Val Glu Val Val Glu Lys Phe Asp Leu Leu Arg Trp Gln		
	150 155 160		
	CGT AGG AAG GTT ACT AAG ATC GTT GTA AAG ACC CCC GAT GTG GTG		965
	Arg Arg Lys Val Thr Lys Ile Val Val Lys Thr Pro Asp Val Val		
	165 170 175		
	AGG GTG CTC CGT GAC AAG GTT CCA CGC GCC TGG GAG GCC AAT ATA		1010
	Arg Val Leu Arg Asp Lys Val Pro Arg Ala Trp Glu Ala Asn Ile		
	180 185 190		
	AAG TTT CAC CAC AAC TAT ATA TAT GAT TAT GGG CTA GTG CCT GGA		1055
	Lys Phe His His Asn Tyr Ile Tyr Asp Tyr Gly Leu Val Pro Gly		
	195 200 205		
	ATG AAG TAC CGC GTC GGG AAG GGC AGG CTA ATC CTC CTG GGG GGA		1100
	Met Lys Tyr Arg Val Gly Lys Gly Arg Leu Ile Leu Leu Gly Gly		
	210 215 220		
	GAG GCT AGC GGG GAC GAT GAG CGC CAT ATA CGC GAG ATA TTC AGT		1145
	Glu Ala Ser Gly Asp Asp Glu Arg His Ile Arg Glu Ile Phe Ser		
	225 230 235		
	GGT GAG GAT GAA AGC ACT ATT GAG ATG GCA GTA AAA TGG CTC TCC		1190
	Gly Glu Asp Glu Ser Thr Ile Glu Met Ala Val Lys Trp Leu Ser		
	240 245 250		
	CTG TTT GAG CAG CCT CCC CCT AAG CCT CGT AGA CTT GCA GTG GAC		1235
	Leu Phe Glu Gln Pro Pro Pro Lys Pro Arg Arg Leu Ala Val Asp		

29	255	260	265	30
	ATC GAG GTA TTC ACT CCC TTC AAG GGC CGT ATA CCA GAC CCT TCC			1280
	Ile Glu Val Phe Thr Pro Phe Lys Gly Arg Ile Pro Asp Pro Ser			
	270	275	280	
	ACA GCC AGC TAC CCT GTA ATC AGT GTA GCT ATG TCC TCG GAC GAG			1325
	Thr Ala Ser Tyr Pro Val Ile Ser Val Ala Met Ser Ser Asp Glu			
	285	290	295	
	GGG TGG CGC GCG GTC TAT GTG CTG GCG CGC CCG GGC GTG CCT ATG			1370
	Gly Trp Arg Ala Val Tyr Val Leu Ala Arg Pro Gly Val Pro Met			
	300	305	310	
	AAT CCC CCG CGT GGC CCA TTA CCC GAG AAT CTA CAC GTA GAG ATA			1415
	Asn Pro Pro Arg Gly Pro Leu Pro Glu Asn Leu His Val Glu Ile			
	315	320	325	
	TTC GAC GAT GAG CGT GCA CTC ATA TTG GAG GCG TTC CGG CTT ATA			1460
	Phe Asp Asp Glu Arg Ala Leu Ile Leu Glu Ala Phe Arg Leu Ile			
	330	335	340	
	TCA AAC TAC CCG GTG CTG CTC ACC TTC AAC GGT GAT AAC TTT GAC			1505
	Ser Asn Tyr Pro Val Leu Leu Thr Phe Asn Gly Asp Asn Phe Asp			
	345	350	355	
	CTC CCC TAC CTC TAC AAC CCG GCA GTA AAA CTA GGC ATA CCA CGC			1550
	Leu Pro Tyr Leu Tyr Asn Arg Ala Val Lys Leu Gly Ile Pro Arg			
	360	365	370	
	GAG TAC ATA CCA TTC CGT GCT AGA AGC GAC TAT GTG ACA TTG GAG			1595
	Glu Tyr Ile Pro Phe Arg Ala Arg Ser Asp Tyr Val Thr Leu Glu			
	375	380	385	
	TAC GGC TTC CAT ATA GAC CTC TAT AAG TTC TTC AGC ACC AAG GCG			1640
	Tyr Gly Phe His Ile Asp Leu Tyr Lys Phe Phe Ser Thr Lys Ala			
	390	395	400	
	GTT CAG GCA TAT GCC TTC GGC AAC GCT TAC CAG GAG TTC ACC CTT			1685
	Val Gln Ala Tyr Ala Phe Gly Asn Ala Tyr Gln Glu Phe Thr Leu			
	405	410	415	
	GAT GCT ATA GCC TCT GCG TTG CTG GGG GAG CAC AAG GTG GAG GTC			1730
	Asp Ala Ile Ala Ser Ala Leu Leu Gly Glu His Lys Val Glu Val			
	420	425	430	
	GAG TCT ACT GTA AGC GAC CTA CCA TTC TTT GAG CTG GTC AGG TAT			1775
	Glu Ser Thr Val Ser Asp Leu Pro Phe Phe Glu Leu Val Arg Tyr			
	435	440	445	
	AAT GTG CGT GAC GCT GAT CTA ACC CTT AGG CTA ACA ACG TTC AAC			1820
	Asn Val Arg Asp Ala Asp Leu Thr Leu Arg Leu Thr Thr Phe Asn			
	450	455	460	
	AAC GAC CTG GTA TGG TCC CTT ATC ATA CTG CTA ATG CGT ATC TCC			1865
	Asn Asp Leu Val Trp Ser Leu Ile Ile Leu Leu Met Arg Ile Ser			
	465	470	475	
	AAG CTG CCT CTG GAG GAT GTC ACG AGA AGC CAG GTC TCA GCT TGG			1910
	Lys Leu Pro Leu Glu Asp Val Thr Arg Ser Gln Val Ser Ala Trp			
	480	485	490	
	GTG AAC AGC TTA TTC TAC TGG GAG CAT AGG AGG AGG GGC TAC CTA			1955
	Val Lys Ser Leu Phe Tyr Trp Glu His Arg Arg Arg Gly Tyr Leu			
	495	500	505	
	ATA CCA TCA AGG GAG GAG ATA ATA CGG CTT AAG GGC ACC ACC CGC			2000

31

32

Ile Pro Ser Arg Glu Glu Ile Ile Arg Leu Lys Gly Thr Thr Arg		
510	515	520
TCT GAA GCC CTG ATA AAG GGT AAG AAG TAT CAG GGG GCG CTA GTC	2045	
Ser Glu Ala Leu Ile Lys Gly Lys Lys Tyr Gln Gly Ala Leu Val		
525	530	535
CTT GAC CCG CCT AGC GGC ATA TAC TTC AAC ATA GTG GTG CTT GAC	2090	
Leu Asp Pro Pro Ser Gly Ile Tyr Phe Asn Ile Val Val Leu Asp		
540	545	550
TTC GCC AGC CTG TAC CCC AGT ATA ATA AAG AGG TGG AAC CTA AGC	2135	
Phe Ala Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Lys Arg Trp Asn Leu Ser		
555	560	565
TAC GAG ACC GTA AAC CCC GTA TAC TGC CCC GAA TCG AAG CTA GTG	2180	
Tyr Glu Thr Val Asn Pro Val Tyr Cys Pro Glu Ser Lys Leu Val		
570	575	580
GAG GTT CCC GAT GTA GGG CAT AAG GTG TGC ATG AGC ATA CCC GGC	2225	
Glu Val Pro Asp Val Gly His Lys Val Cys Met Ser Ile Pro Gly		
585	590	595
CTG ACC TCG CAG ATA GTT GGC CTG CTT AGG GAC TAT CGA GTC AAG	2270	
Leu Thr Ser Gln Ile Val Gly Leu Leu Arg Asp Tyr Arg Val Lys		
600	605	610
ATA TAC AAG AAG AAG GCC AAG GAT AAG AGT CTG CCG GAT GAT GTT	2315	
Ile Tyr Lys Lys Lys Ala Lys Asp Lys Ser Leu Pro Asp Asp Val		
615	620	625
AGA GCA TGG TAT AAT ACA GTC CAG GCA GCC ATG AAG GTG TAT ATA	2360	
Arg Ala Trp Tyr Asn Thr Val Gln Ala Ala Met Lys Val Tyr Ile		
630	635	640
AAT GCC AGC TAT GGA GTC TTC GGG GCC GAG AGC TTC CCG TTC TAC	2405	
Asn Ala Ser Tyr Gly Val Phe Gly Ala Glu Ser Phe Pro Phe Tyr		
645	650	655
GCG CCG CCG GTA GCG GAG AGC GTC ACA GCC ATA GGC AGG TAT ACT	2450	
Ala Pro Pro Val Ala Glu Ser Val Thr Ala Ile Gly Arg Tyr Thr		
660	665	670
ATC AAG CAG ACG CTG CAG AAG GCT GGC GAA CTA GGC CTC CGC GTG	2495	
Ile Lys Gln Thr Leu Gln Lys Ala Gly Glu Leu Gly Leu Arg Val		
675	680	685
CTC TAT GGC GAT ACG GAC TCA CTA TTC ATA TGG AAT CCA GAT GAG	2540	
Leu Tyr Gly Asp Thr Asp Ser Leu Phe Ile Trp Asn Pro Asp Glu		
690	695	700
GAT AAG CTG CGG GAG CTG CAA GAG TAT GTA GAG AAG AAC TTT GGC	2585	
Asp Lys Leu Arg Glu Leu Gln Glu Tyr Val Glu Lys Asn Phe Gly		
705	710	715
CTA GAC CTT GAG GTT GAT AAG GTC TAT AAA TTC GTG ACA TTT AGC	2630	
Leu Asp Leu Glu Val Asp Lys Val Tyr Lys Phe Val Thr Phe Ser		
720	725	730
GGC CTG AAG AAG AAC TAT ATA GGC GCC TAC GAG GAT GGA AGC ATC	2675	
Gly Leu Lys Lys Asn Tyr Ile Gly Ala Tyr Glu Asp Gly Ser Ile		
735	740	745
GAT GTC AAG GGT ATG GTC GCT AAG AAG CGT AAT ACG CCG GAG TTC	2720	
Asp Val Lys Gly Met Val Ala Lys Lys Arg Asn Thr Pro Glu Phe		
750	755	760

(18)

特開平7-327684

33	CTC AAG AAG GAG TTT AGC GAG ATG CTA GCA GTT ATA GGC TCT GTT	34
	Leu Lys Lys Glu Phe Ser Glu Met Leu Ala Val Ile Gly Ser Val	2765
765	770	775
AAG AGC CCT GAG GAC TTC ATA AAG GTG AGG AGA GTT ATA CGT GAA		2810
Lys Ser Pro Glu Asp Phe Ile Lys Val Arg Arg Val Ile Arg Glu		
780	785	790
AGG CTG CGC AAA GTA TAC CAT GGC CTG CGC GAC CTG GAG TTC AAC		2855
Arg Leu Arg Lys Val Tyr His Gly Leu Arg Asp Leu Glu Phe Asn		
795	800	805
TTA GAC GAG CTA GCC ATA AGG ATG GCT TTA AAC AAG CCC GTT GAG		2900
Leu Asp Glu Leu Ala Ile Arg Met Ala Leu Asn Lys Pro Val Glu		
810	815	820
GCC TAT ACC AAG AAT ACG CCC CAG CAT GTG AAG GCT GCG CGG CAG		2945
Ala Tyr Thr Lys Asn Thr Pro Gln His Val Lys Ala Ala Arg Gln		
825	830	835
CTC ATA AGG GCG GGG GTG CAG GTG CTG CCA GGT GAT GTC ATA TCC		2990
Leu Ile Arg Ala Gly Val Gln Val Leu Pro Gly Asp Val Ile Ser		
840	845	850
TTC GTT AAA GTG AAG GGC AAG GAG GGT GTT AAG CCG GTC CAA CTC		3035
Phe Val Lys Val Lys Gly Lys Glu Gly Val Lys Pro Val Gln Leu		
855	860	865
GCA AGA CTG CCG GAG GTT GAT GTA GAG AAG TAT GTG GAG AGC ATG		3080
Ala Arg Leu Pro Glu Val Asp Val Glu Lys Tyr Val Glu Ser Met		
870	875	880
AGG AAT GTG TTT GAA CAG CTA CTG CTT GCA ATA AGT ATG TCG TGG		3125
Arg Asn Val Phe Glu Gln Leu Leu Leu Ala Ile Ser Met Ser Trp		
885	890	895
GAT GAG ATA ATA GGC TCC TCG AGG CTT GAG GCC TTC TTT AGC CGC		3170
Asp Glu Ile Ile Gly Ser Ser Arg Leu Glu Ala Phe Phe Ser Arg		
900	905	910
CGG GGC TAGCTTGAAG AAAGCTATCT TTTCGGCTT CTACGCCTCT TCTTAGGCCT		3226
Arg Gly		
CTCCTCTAGC TCTTCCAAGC CTTCCTCGAG TCGCTTGATC TCCTCTTCGC CAAGCGATAG		3286
CTGTGCCTCC CCGCCCATCT TCTTGGGCTC TTTTGTGGCC TCTATGGCGT ACTCCTCTAG		3346
CTGTGCTTTT GCCGCCTCGT CAAGGTAGTA GGATATCACA TACATCGGTC TGTCAGGTA		3406
TGGTCTCTCG AGCCATGCAT TATCGAAGCT T		3437

【0046】配列番号: 8

配列の長さ: 3068

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源:

生物名: ピロディクティウム オクルタム (Pyrodicti
um occultum)40 株名: DSM2709[†]

配列の特徴:

配列:

CTGCAGCTCT CGGGGCTACA GCTCCTTCGT GCTCGAGGTG GAGGCCGGCA ACTATCCAGC	60
GCAGAGCCTA TATGCGAGAA GCTCCTTCAA GCCCGTCATG ATAGTGCCCG ACTACTATGG	120
CGAGGGCCGG CACGCTGTGG TCATGGCGTT GTTGGGGGAG AGGCCCTGCT GCCTAGACGG	180
CTAGCCCTCC TCATGCGTTA GCGGGCAGAG GCAGGCAATG ATATACGATT ATGTAGGGGC	240
GGTGGTGGT AGATTCTCCA GGGCAGAGCC AGCCC ATG ACA GAG ACT ATA GAG TTC	296
Met Thr Glu Thr Ile Glu Phe	

1

5

35	36
GTG CTG CTA GAC TCT AGC TAC GAG ATA CTG GGG AAG GAG CCG GTA	341
Val Leu Leu Asp Ser Ser Tyr Glu Ile Leu Gly Lys Glu Pro Val	
10 15 20	
GTA ATC CTC TGG GGG ATA ACG CTT GAC GGT AAA CGT GTC GTG CTT	386
Val Ile Leu Trp Gly Ile Thr Leu Asp Gly Lys Arg Val Val Leu	
25 30 35	
CTA GAC CAC CGC TTC CGC CCC TAC TTC TAC GCC CTC ATA GCC CGG	431
Leu Asp His Arg Phe Arg Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Ile Ala Arg	
40 45 50	
GGC TAT GAG GAT ATG GTG GAG GAG ATA GCA GCT TCC ATA AGG AGG	476
Gly Tyr Glu Asp Met Val Glu Glu Ile Ala Ala Ser Ile Arg Arg	
55 60 65	
CTT AGT GTG GTC AAG AGT CCG ATA ATA GAT GCC AAG CCT CTT GAT	521
Leu Ser Val Val Lys Ser Pro Ile Ile Asp Ala Lys Pro Leu Asp	
70 75 80	
AAG AGG TAC TTC GGC AGG CCC CGT AAG GCG GTG AAG ATT ACC ACT	566
Lys Arg Tyr Phe Gly Arg Pro Arg Lys Ala Val Lys Ile Thr Thr	
85 90 95	
ATG ATA CCC GAG TCT GTT AGA CAC TAC CGC GAG GCG GTG AAG AAG	611
Met Ile Pro Glu Ser Val Arg His Tyr Arg Glu Ala Val Lys Lys	
100 105 110	
ATA GAG GGT GTG GAG GAC TCC CTC GAG GCA GAT ATA AGG TTT GCA	656
Ile Glu Gly Val Glu Asp Ser Leu Glu Ala Asp Ile Arg Phe Ala	
115 120 125	
ATG AGA TAT CTG ATA GAT AAG AGG CTC TAC CCG TTC ACG GTT TAC	701
Met Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Arg Leu Tyr Pro Phe Thr Val Tyr	
130 135 140	
CGG ATC CCC GTA GAG GAT GCG GGC CGC AAT CCA GGC TTC CGT GTT	746
Arg Ile Pro Val Glu Asp Ala Gly Arg Asn Pro Gly Phe Arg Val	
145 150 155	
GAC CGT GTC TAC AAG GTT GCT GGC GAC CCG GAG CCC CTA GCG GAT	791
Asp Arg Val Tyr Lys Val Ala Gly Asp Pro Glu Pro Leu Ala Asp	
160 165 170	
ATA ACG CGG ATC GAC CTT CCC CCG ATG AGG CTG GTA GCT TTT GAT	836
Ile Thr Arg Ile Asp Leu Pro Pro Met Arg Leu Val Ala Phe Asp	
175 180 185	
ATA GAG GTG TAT AGC AGG AGG GGG AGC CCT AAC CCT GCA AGG GAT	881
Ile Glu Val Tyr Ser Arg Arg Gly Ser Pro Asn Pro Ala Arg Asp	
190 195 200	
CCA GTG ATA ATA GTG TCG CTG AGG GAC AGC GAG GGC AAG GAG AGG	926
Pro Val Ile Ile Val Ser Leu Arg Asp Ser Glu Gly Lys Glu Arg	
205 210 215	
CTC ATA GAA GCT GAA GGC CAT GAC GAC AGG AGG GTT CTG AGG GAG	971
Leu Ile Glu Ala Glu Gly His Asp Asp Arg Arg Val Leu Arg Glu	
220 225 230	
TTC GTA GAG TAC GTG AGA GCC TTC GAC CCC GAC ATA ATA GTG GGC	1016
Phe Val Glu Tyr Val Arg Ala Phe Asp Pro Asp Ile Ile Val Gly	
235 240 245	
TAT AAC AGT AAC CAC TTC GAC TGG CCC TAC CTA ATG GAG CGC GCC	1061
Tyr Asn Ser Asn His Phe Asp Trp Pro Tyr Leu Met Glu Arg Ala	

37			38
250	255	260	
CGT AGG CTC GGG ATT AAG CTC GAC GTT ACA CGC CGT GTG GGG GCA			1106
Arg Arg Leu Gly Ile Lys Leu Asp Val Thr Arg Arg Val Gly Ala			
265	270	275	
GAG CCC ACC ACC AGC GTC TAC GGC CAC GTC TCG GTG CAG GGT AGG			1151
Glu Pro Thr Thr Ser Val Tyr Gly His Val Ser Val Gln Gly Arg			
280	285	290	
CTG AAC GTG GAC CTC TAC GAC TAT GCC GAG GAG ATG CCG GAG ATA			1196
Leu Asn Val Asp Leu Tyr Asp Tyr Ala Glu Glu Met Pro Glu Ile			
295	300	305	
AAG ATG AAG ACG CTT GAG GAG GTA GCG GAG TAC CTA GGC GTT ATG			1241
Lys Met Lys Thr Leu Glu Glu Val Ala Glu Tyr Leu Gly Val Met			
310	315	320	
AAG AAG AGC GAG CGT GTG ATA ATA GAG TGG TGG AGG ATA CCC GAG			1286
Lys Lys Ser Glu Arg Val Ile Ile Glu Trp Trp Arg Ile Pro Glu			
325	330	335	
TAC TGG GAT GAC GAG AAG AAG AGG CAG CTG CTA GAG CGC TAC GCG			1331
Tyr Trp Asp Asp Glu Lys Lys Arg Gln Leu Leu Glu Arg Tyr Ala			
340	345	350	
CTC GAC GAT GTG AGG GCT ACC TAC GGC CTC GCG GAA AAG ATG CTA			1376
Leu Asp Asp Val Arg Ala Thr Tyr Gly Leu Ala Glu Lys Met Leu			
355	360	365	
CCG TTC GCC ATA CAG CTC TCC ACT GTT ACG GGT GTG CCT CTC GAC			1421
Pro Phe Ala Ile Gln Leu Ser Thr Val Thr Gly Val Pro Leu Asp			
370	375	380	
CAG GTA GGT GCT ATG GGC GTA GGC TTC CGC CTA GAG TGG TAT CTC			1466
Gln Val Gly Ala Met Gly Val Gly Phe Arg Leu Glu Trp Tyr Leu			
385	390	395	
ATG CGT GCA GCC TAC GAT ATG AAC GAG CTG GTG CCG AAC CGG GTG			1511
Met Arg Ala Ala Tyr Asp Met Asn Glu Leu Val Pro Asn Arg Val			
400	405	410	
GAG AGG AGG GGG GAG AGC TAC AAG GGT GCA GTA GTG TTA AAG CCT			1556
Glu Arg Arg Gly Glu Ser Tyr Lys Gly Ala Val Val Leu Lys Pro			
415	420	425	
CTC AAG GGA GTC CAT GAG AAT GTT GTG GTG CTC GAT TTC AGT TCC			1601
Leu Lys Gly Val His Glu Asn Val Val Val Leu Asp Phe Ser Ser			
430	435	440	
ATG TAC CCG AGC ATA ATG ATA AAG TAC AAC GTG GGC CCC GAC ACT			1646
Met Tyr Pro Ser Ile Met Ile Lys Tyr Asn Val Gly Pro Asp Thr			
445	450	455	
ATA GTC GAC GAC CCC TCG GAG TGC CCA AAG TAC GGC GGC TGC TAT			1691
Ile Val Asp Asp Pro Ser Glu Cys Pro Lys Tyr Gly Gly Cys Tyr			
460	465	470	
GTA GCC CCC GAG GTC GGG CAC CGG TTC CGT CGC TCC CCG CCA GGC			1736
Val Ala Pro Glu Val Gly His Arg Phe Arg Arg Ser Pro Pro Gly			
475	480	485	
TTC TTC AAG ACC GTG CTC GAG AAC CTA CTG AAG CTA CGC CGA CAG			1781
Phe Phe Lys Thr Val Leu Glu Asn Leu Leu Lys Leu Arg Arg Gln			
490	495	500	
GTA AAG GAG AAG ATG AAG GAG TTT CCG CCT GAC AGC CCC GAG TAC			1826

(21)

特開平7-327684

39

40

Val Lys Glu Lys Met Lys Glu Phe Pro Pro Asp Ser Pro Glu Tyr	
505	510 515
AGG CTC TAC GAT GAG CGC CAG AAG GCG CTC AAG GTT CTT GCG AAC	1871
Arg Leu Tyr Asp Glu Arg Gln Lys Ala Leu Lys Val Leu Ala Asn	
520	525 530
GCG AGC TAT GGC TAC ATG GGG TGG AGC CAT GCC CGC TGG TAC TGC	1916
Ala Ser Tyr Gly Tyr Met Gly Trp Ser His Ala Arg Trp Tyr Cys	
535	540 545
AAA CGC TGC GCC GAG GCT GTC ACA GCC TGG GGC CGT AAC CTT ATA	1961
Lys Arg Cys Ala Glu Ala Val Thr Ala Trp Gly Arg Asn Leu Ile	
550	555 560
CTG ACA GCT ATC GAG TAT GCC AGG AAG CTC GGC CTA AAG GTT ATA	2006
Leu Thr Ala Ile Glu Tyr Ala Arg Lys Leu Gly Leu Lys Val Ile	
565	570 575
TAT GGA GAC ACC GAC TCC CTC TTC GTG GTC TAT GAC AAG GAG AAG	2051
Tyr Gly Asp Thr Asp Ser Leu Phe Val Val Tyr Asp Lys Glu Lys	
580	585 590
GTT GAG AAG CTG ATA GAG TTT GTC GAG AAG GAG CTG GGC TTT GAG	2096
Val Glu Lys Leu Ile Glu Phe Val Glu Lys Glu Leu Gly Phe Glu	
595	600 605
ATA AAG ATA GAC AAG ATC TAC AAG AAA GTG TTC TTC ACG GAG GCT	2141
Ile Lys Ile Asp Lys Ile Tyr Lys Lys Val Phe Phe Thr Glu Ala	
610	615 620
AAG AAG CGC TAT GTA GGT CTC CTC GAG GAC GGA CGT ATA GAC ATC	2186
Lys Lys Arg Tyr Val Gly Leu Leu Glu Asp Gly Arg Ile Asp Ile	
625	630 635
GTG GGC TTT GAA GCA GTC CGC GGC GAC TGG TGC GAG CTG GCT AAG	2231
Val Gly Phe Glu Ala Val Arg Gly Asp Trp Cys Glu Leu Ala Lys	
640	645 650
GAG GTG CAG GAG AAG GCG GCT GAG ATA GTG TTG AAT ACG GGG AAC	2276
Glu Val Gln Glu Lys Ala Ala Glu Ile Val Leu Asn Thr Gly Asn	
655	660 665
GTG GAC AAG GCT ATA AGC TAC ATA AGG GAG GTA ATA AAG CAG CTC	2321
Val Asp Lys Ala Ile Ser Tyr Ile Arg Glu Val Ile Lys Gln Leu	
670	675 680
CGC GAG GGC AAG GTG CCA ATA ACA AAG CTT ATC ATA TGG AAG ACG	2366
Arg Glu Gly Lys Val Pro Ile Thr Lys Leu Ile Ile Trp Lys Thr	
685	690 695
CTG AGC AAG AGG ATA GAG GAG TAC GAG CAT GAC GCG CCT CAT GTG	2411
Leu Ser Lys Arg Ile Glu Glu Tyr Glu His Asp Ala Pro His Val	
700	705 710
ATG GCT GCA CGG CGT ATG AAG GAG GCA GGC TAC GAG GTG TCT CCC	2156
Met Ala Ala Arg Arg Met Lys Glu Ala Gly Tyr Glu Val Ser Pro	
715	720 725
GGC GAT AAG GTG GGC TAC GTC ATA GTT AAG GGT AGC GGG AGT GTG	2501
Gly Asp Lys Val Gly Tyr Val Ile Val Lys Gly Ser Gly Ser Val	
730	735 740
TCC AGC AGG GCC TAC CCC TAC TTC ATG GTT GAT CCA TCG ACC ATC	2546
Ser Ser Arg Ala Tyr Pro Tyr Phe Met Val Asp Pro Ser Thr Ile	
745	750 755

41
 GAC GTC AAC TAC TAT ATT GAC CAC CAG ATA GTG CCG GCT GCT CTG
 Asp Val Asn Tyr Tyr Ile Asp His Gln Ile Val Pro Ala Ala Leu
 760 765 770
 AGG ATA CTC TCC TAC TTC GGA GTC ACC GAG AAA CAG CTC AAG GCG
 Arg Ile Leu Ser Tyr Phe Gly Val Thr Glu Lys Gln Leu Lys Ala
 775 780 785
 GCG GCT ACG GTG CAG AGA AGC CTC TTC GAC TTC TTC GCC TCA AAG
 Ala Ala Thr Val Gln Arg Ser Leu Phe Asp Phe Phe Ala Ser Lys
 790 795 800
 AAA TAGCTCCTCC ACCCGGCTAG CTTTATTAAA CGCGTAGGCA CAAGCTCTCC
 Lys
 GAGAGGCCTG GAGGGTAAGG GGTGCAATAG AGCCAGCCTC TCCGCCGAGG CCGTGGGCTC 2794
 TTGGGTGGCT TCGAATGATC CTCGCATCCT GGAGATCCTT GCCGTGGATA GTAAGGCGTG 2854
 TCGACGTAGT ACTCGAGGTT GTCGATGCGC GCGACCCGGT CTCGACAAGG AGCCTGCCGC 2914
 TAGAGAGGAT GGTGCAGAGC CTAGGGAAGC GCCTCCTAAT AGTCATCAAT AAGGCTGACC 2974
 TGGTCCCCCG CGGGGTGGCT GAGAAGTGA AGCGCATCCT CGAGGATCAG GGTACCGTA 3034
 CTGTCTACAT GGCTGCCCGC GATCACAAGG GTAC 3068

【0047】配列番号:9

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

GTACATATTG TCGTTAGAAC GCG 23

【0048】配列番号:10

配列の長さ:23

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

TAATACGACT CACTATAGGG AGA 23

【0049】配列番号:11

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

GGGGTCGTCG ACTATAGT 18

【0050】配列番号:12

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

ATACTGACAG CTATCGAG 18

【0051】配列番号:13

配列の長さ:18

配列の型:核酸

20 鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

GTATACGGGG TTTACGGT 18

【0052】配列番号:14

配列の長さ:18

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

30 配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

ATCAAGCAGA CGCTGCAG 18

【0053】配列番号:15

配列の長さ:30

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

40 ATCTCACTGG CGCCATGGAG GCTCAGCCGC 30

【0054】配列番号:16

配列の長さ:25

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

TGCATGGAGC ACCATGGTGC CTCAG 25

【図面の簡単な説明】

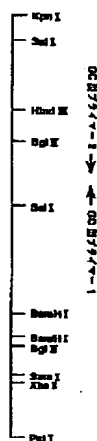
50 【図1】 p P O 5 0 0 -IIに挿入されている約3.1 k

43

bのDNA断片の制限酵素地図、及びPCRに用いたプライマーの位置を示す図である。

【図2】 pPO100-1に挿入されている約4.2 k

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 N 9/12

C 1 2 R 1:19)

C 1 2 R 1:01)

THIS PAGE BLANK (USPTO)